

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental dan metode yang digunakan adalah *post test control group design* yaitu rancangan penelitian yang hasil penelitiannya diamati setelah perlakuan selesai.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang. Pembuatan perasan buah apel dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan, mulai bulan November sampai dengan bulan Desember 2018.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah semua tikus jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan kelamin jantan, usia 2 - 3 bulan, berat badan 150 – 250 gr.

4.3.3 Besar Sampel

Terdapat 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol positif (+), kontrol negatif (-), dan 3 kelompok perlakuan. Penentuan besar replikasi sampel dalam penelitian ditentukan menggunakan rumus pada *Sample Size Calculation in Animal Studies* tahun 2017, yakni sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rumus penentuan jumlah sampel

Annova Design	Application	Minimum n/grup	Maximum n/grup
One-way Annova	Group Comparasion	$10/k + 1$	$20/k + 1$

Keterangan :

n : Jumlah subjek tiap kelompok

k : Jumlah kelompok

Sesuai dengan rumus tersebut maka untuk mendapat sampel atau jumlah subjek tiap kelompoknya dapat dikalkulasikan sebagai berikut :

Jumlah sampel minimum

$$n = 10/k + 1$$

$$n = 10/5 + 1$$

$$n = 3$$

Jumlah sampel maksimum

$$n = 20/k + 1$$

$$n = 20/5 + 1$$

$$n = 5$$

Sehingga dalam penelitian ini jumlah sampel tiap kelompoknya adalah 4 karena diantara rentang jumlah sampel minimum dan maksimum. Maka jika dijumlahkan pada penelitian ini digunakan kurang lebih 25 sampel.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling*.

4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

A. Kriteria Inklusi

1. Tikus *Rattus Novergicus Strain Wistar* jenis kelamin jantan
2. Umur 2–3 bulan
3. Berat Badan 150 – 250 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, bulu yang tebal, mata yang jernih

B. Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit sebelum perlakuan (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, rambut kusam atau rontok atau botak dan keluarnya eksudat yang tidak normal)
2. Tikus yang mati sebelum perlakuan
3. Tikus yang telah digunakan dalam penelitian lain

4.3.6 Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas

Dosis perasan Apel Malang (*Malus sylvestris*)

B. Variabel Tergantung

Penurunan jumlah Sel Eosinofil pada pulmo tikus putih (*Rattus norvegicus*)

4.4 Definisi operasional

A. Perasan Apel Malang (*Malus sylvestris*)

Perasan apel (*Malus sylvestri*) adalah cairan yang didapat dari buah apel yang di juicer. Pemberian perasan apel ini dibedakan menjadi beberapa dosis yakni 15%(v/v), 20%(v/v), dan 25% (v/v) per oral. Widyaningtyas *et all*, mengungkapkan bahwa semakin tinggi dosis pemberian perasan apel maka semakin besar juga pengaruhnya sebagai anti alergi. Hal ni disebabkan karena semakin tinggi kandungan flavonolnya. Skala pada variabel ini adalah kategorik (ordinal).

B. Eosinofil

Sel eosinofil merupakan sel yang granula sitoplasmanya berwarna merah dan memiliki dua lobus. Untuk bisa mengamati sel ini perlu dibuat preparat menggunakan metode parafin dengan pewarnaan HE. Gambaran infiltrasi sel inflamatori diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran lemah (100x) hingga perbesaran kuat (400x). untuk mengetahui jumlah rata – rata sel eosinophil maka dilakukan pengamatan sebanyak 5 lapang pandang pada jaringan peribronkial paru paru. Skala pada variabel ini adalah numerik (rasio).

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

1. Timbangan satuan mg untuk menimbang berat badan tikus
2. Kandang tikus tanpa sekat dengan ukuran 29x19x13 cm dengan tempat pakan dan minum yang telah diisi oleh sekam
3. *Juicer* untuk membuat perasan apel
4. *Nebulizer omron* digunakan untuk paparan ulang ovalbumin 1% melalui inhalasi
5. Alat dan papan bedah
 - Alat bedah minor (skalpel, gunting dan pinset).
 - Tabung plastik untuk fiksasi organ sementara
6. Alat untuk pengamatan struktur histologi paru - paru
 - Mikroskop cahaya pembesaran 400x
 - Kamera digital
7. *Cover glass* dan *object glass*
8. Pisau
9. Gelas ukur
10. Beker *glass*
11. Labu takar
12. Spuit injeksi
13. Spuit oral
14. Pipet
15. Handscoon
16. Sonde

4.5.2 Bahan

1. Tikus

Menggunakan *Rattus norvegicus* strain wistar, jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 150 - 250 gram dengan kondisi sehat yang ditandai gerakan yang aktif, bulu tebal dan mata jernih.

2. Apel Malang (*Malus Sylvestris*)

Perasan buah Apel Malang (*Malus sylvestris*) yang diambil sesuai dengan dosis yang dibutuhkan, kemudian diberikan ke tikus menggunakan sonde peroral.

3. Putih telur ayam untuk induksi ovalbumin

4. Pakan standar BR-1.

5. Aquadest

6. $Al(OH)_3$

7. NaOH

8. Bahan untuk pembuatan preparat paru - paru tikus

- Paraffin
- Alkohol 30%, 50%, 70%, 85% dan 95 %
- Xilol
- Formalin 10 %
- Hematoxilin
- Eosin

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pengelompokan Hewan Coba

Tikus yang digunakan sebanyak 25 ekor yang terbagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus :

- a. Kontrol negatif: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 75 g/hari/tikus serta minum aquades selama 30 hari. Kontrol negatif hanya untuk nilai normal tanpa dimasukkan dalam statistik
- b. Kontrol positif: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 75 g/hari/tikus serta minum aquades. Ditambah dengan pemberian ovalbumin 10 μg dan 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam 0,2 cc normal salin secara intraperitoneal pada hari pertama, hari ke-tujuh dan hari ke-empat belas, dan diberi ovalbumin 1% dalam 10 ml normal salin secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit pada hari ke- sembilan belas sampai hari ke-dua puluh dua. Kontrol positif hanya sebagai pembanding.
- c. Kelompok III: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 75 g/hari/tikus serta minum aquades. Ditambah dengan pemberian ovalbumin 10 μg dan 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam 0,2 cc normal salin secara intraperitoneal pada hari pertama, hari ke-tujuh dan hari ke-empat belas, dan diberi ovalbumin 1% dalam 10 ml normal salin secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit pada hari ke- sembilan belas sampai hari ke-dua puluh dua. Serta diberikan perasan buah apel 3ml dengan kadar 15% (v/v) secara peroral pada hari ke- lima belas sampai hari ke- dua puluh dua.

- d. Kelompok IV: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 75 g/hari/tikus serta minum aquades. Ditambah dengan pemberian ovalbumin 10 μg dan 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam 0,2 cc normal salin secara intraperitoneal pada hari pertama, hari ke-tujuh dan hari ke-empat belas, dan diberi ovalbumin 1% dalam 10 ml normal salin secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit pada hari ke- sembilan belas sampai hari ke-dua puluh dua. Serta diberikan perasan buah apel 3ml dengan kadar 20% (v/v) secara peroral pada hari ke- lima belas sampai hari ke- dua puluh dua.
- e. Kelompok V: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 75 g/hari/tikus serta minum aquades. Ditambah dengan pemberian ovalbumin 10 μg dan 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam 0,2 cc normal salin secara intraperitoneal pada hari pertama, hari ke-tujuh dan hari ke-empat belas, dan diberi ovalbumin 1% dalam 10 ml normal salin secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit pada hari ke- sembilan belas sampai hari ke-dua puluh dua. Serta diberikan perasan buah apel 3ml dengan kadar 25% (v/v) secara peroral pada hari ke- lima belas sampai hari ke- dua puluh dua.

4.6.2 Dasar Penentuan Dosis

Rekomendasi minuman perasan Apel Malang (*Malus Sylvestris*) untuk manusia dikonsumsi sebanyak 200 ml perhari (Cempaka, Santoso, & Tanuwijaya, 2014). Sehingga dilakukan konversi dosis dari manusia ke tikus menjadi 4ml/200gBB atau 3ml/150gBB perhari sesuai tabel konversi dosis.

	20 g Mencit	200 g Tikus	400 g Marmot	1,5 kg Kelinci	2,0 kg Kucing	4,0 kg Kera	12,0 kg Anjing	70 kg Manusia
20 g Mencit	1,0	7,0	12,29	27,8	29,7	84,1	124,2	387,9
200 g Tikus	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	17,8	17,8	56,0
400 g Marmot	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	10,2	10,2	31,5
1,5 kg Kelinci	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	4,5	4,5	14,2
2,0 kg Kucing	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	4,1	4,1	13,0
4,0 kg Kera	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,9	1,9	6,1
12,0 kg Anjing	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	1,0	1,0	3,1
70 kg Manusia	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Anggara, 2009)

Dilakukan konversi untuk dosis pada tikus dengan perhitungan :

Faktor konversi = 0,018

Dosis Tikus = 200 ml/70kg BB x 0,018 = 3,6 ml/200g BB = 4 ml/200gBB

$$\frac{4}{x} = \frac{200}{150} \Rightarrow x = 3 \text{ ml}$$

4.6.3 Pemberian Perasan Buah Apel

Dosis perasan buah apel (*Malus sylvestris*) yang diberikan, yaitu sebesar :

Dosis I : 3ml dengan kadar 15% (v/v)

Dosis II : 3ml dengan kadar 20% (v/v)

Dosis III : 3ml dengan kadar 25% (v/v)

Penelitian Widyaningtyas *et al* membuktikan perasan buah apel kadar 15% memiliki efek anti alergi terhadap respon anti alergi pada tikus jantan galur wistar yang signifikan dengan ovalbumin.

4.6.4 Pembuatan Perasan Buah Apel

Buah Apel (*Malus sylvestris*) Sebanyak 100 gram buah apel dijuicer dan ditampung perasannya kemudian hasil perasan tersebut dibuat dalam kadar 15% (v/v), 20%(v/v), 25%(v/v).

- Kadar 15% (v/v) : Perasan buah Apel (*Malus sylvestris*) murni yang telah dibuat dalam proses *juicing* dilarutkan dalam aquadest dengan takaran 15ml untuk perasan buah Apel dan 100ml untuk aquadest, kemudian dibagi dalam dosis 3ml untuk pemberian satu tikus coba.
- Kadar 20% (v/v) : Perasan buah Apel (*Malus sylvestris*) murni yang telah dibuat dalam proses *juicing* dilarutkan dalam aquadest dengan takaran 20ml untuk perasan buah Apel dan 100ml untuk aquadest, kemudian dibagi dalam dosis 3ml untuk pemberian satu tikus coba.
- Kadar 25% (v/v) : Perasan buah Apel (*Malus sylvestris*) murni yang telah dibuat dalam proses *juicing* dilarutkan dalam aquadest dengan takaran 25ml untuk perasan buah apel dan 100ml untuk aquadest, kemudian dibagi dalam dosis 3ml untuk pemberian satu tikus coba.

4.6.5 Pembuatan Ovalbumin

Pembuatan larutan ovalbumin sebagai alergen dapat dilakukan dengan menggunakan 1 butir telur ayam yang dimabil putihnya kemudian diaduk hingga tidak terdapat gumpalan dan bau amis yang hilang.

4.6.6 Pemaparan ulang Ovalbumin

Pada proses pemaparan ulang ovalbumin diberikan ovalbumin 1% melalui inhalasi menggunakan nebulizer Omron.

4.6.7 Adaptasi

Aklimatisasi hewan coba dalam kandang yang diletakkan di tempat pemeliharaan tikus laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang selama 7 hari dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru.

4.6.8 Proses anastesi dan pembedahan

Pada tahap ini dilakukan dengan memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang didalamnya telah diletakkan kapas yang mengandung kloroform. Pembiusan dilakukan satu persatu dengan harapan pembiusan dapat dilakukan secara inhalasi dengan dosis eter 0,67 mL/hewan coba selama \pm 60 detik. Selanjutnya, ketika hewan coba sudah teranastesi yang ditandai dengan tidak adanya respon nyeri, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation*.

Selanjutnya tikus diletakkan pada meja paraffin dan keempat kaki tikus difiksasi menggunakan jarum pentul. Setelah itu dilakukan proses pembedahan.

4.7 Pembuatan Sediaan Histopatologi Paru - Paru Tikus

Cara pembuatan sediaan histopatologi paru - paru:

1. Tikus dibius menggunakan kloroform.
2. Toraks tikus dibedah untuk mengambil paru - paru tikus.

3. Irisan paru - paru diletakkan pada tabung organ dan difiksasi dengan formalin 10 % selama 1 hari.
4. Melakukan dehidrasi dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu pada konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, dan 2 kali alkohol absolut masing-masing selama 30 menit.
5. Melakukan clearing dengan menggunakan alkohol dan xilol sebanyak 2 kali selama 1 jam dengan perbandingan xilon : parafin (3:1, 1:1, 1:3) dengan menggunakan xilol murni sebanyak 2 kali masing-masing selama 60 menit.
6. Melakukan proses infiltrasi dengan xilon dan parafin dengan perbandingan xilon:parafin (3:1, 1:1, 1:3) dan 2 kali xilon murni pada suhu 46°- 25° masing-masing selama 24 jam.
7. Dilakukan blocking dengan parafin keras pada suhu 46°- 25° selama 60 menit.
8. Memotong paru - paru dengan mikrotom yang berukuran 3-5 milimikron dan potongan direkatkan pada kaca objek.
9. Memanaskan pada suhu 46°- 25° didalam inkubator selama 24 jam.
10. Melakukan deparafinisasi yaitu dengan perendaman xilol sebanyak 2 kali, serta merendam dalam alkohol absolut 30%, 50%, 70%, 85%, 95% dan H₂O masing-masing selama 3 menit.
11. Melakukan pewarnaan hematoxilin eosin dengan langkah-langkah sebagai berikut :
 - Pemberian *Hematoxilin* selama 15 detik
 - *Eosin staining* selama 15-20 menit

- Dehidrasi pada alkohol bertingkat 50%, 70%, 85%, 95% dan 2 kali alkohol absolut
- Pemberian xilol selama 5 menit
- *Mounting* menggunakan perekat entelan
- Panaskan pada suhu 46°- 25° didalam inkubator selama 24 jam

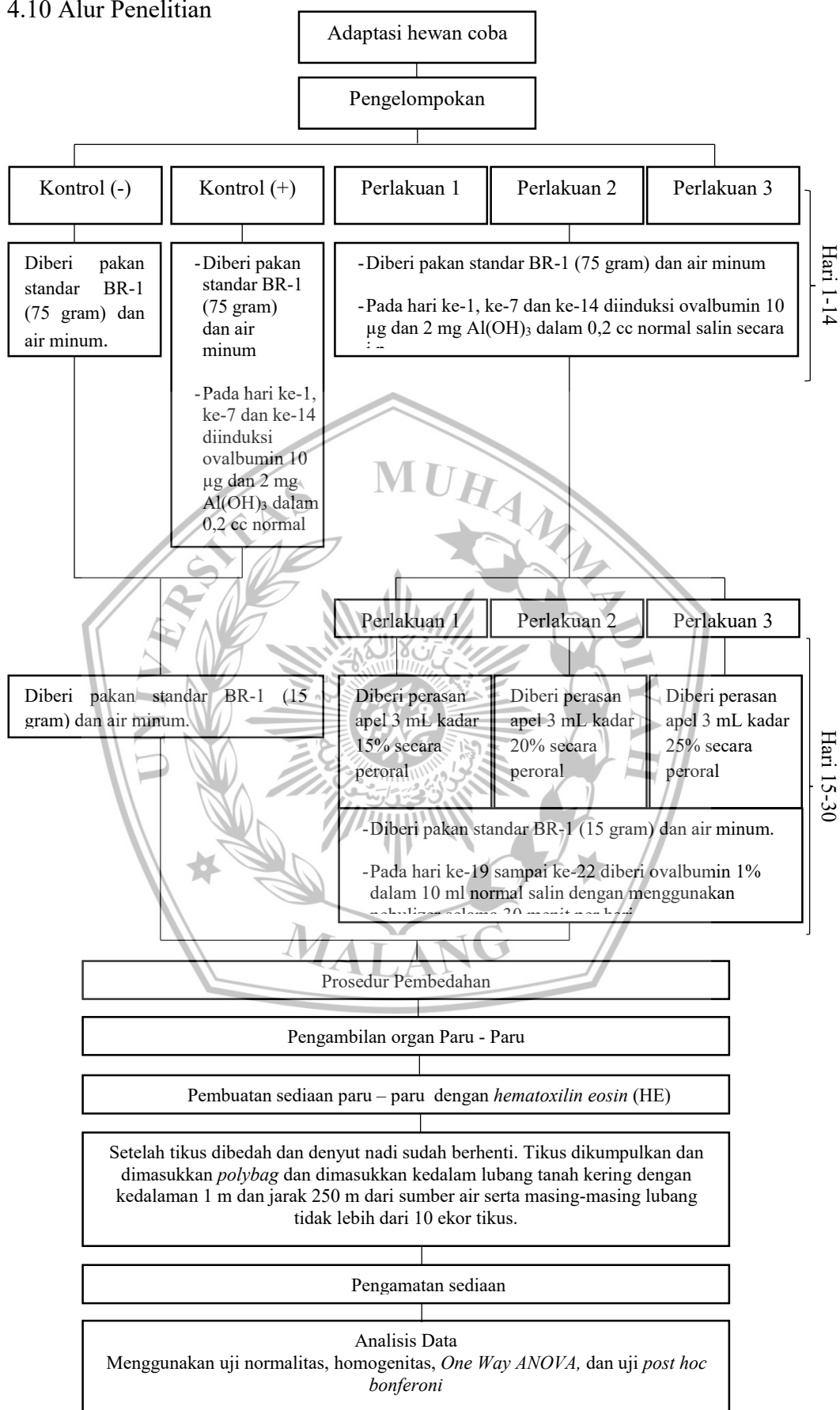
4.8 Penguburan Hewan Coba

Tikus yang telah diberi perlakuan akan diteliti dipastikan mati, bangkai tikus diletakkan dalam polybag. Bangkai tikus percobaan dikubur di tanah dengan kedalaman 1 m dan luas lubang 0, 25 m². Setiap lubang hanya digunakan untuk mengubur 10 tikus secara bersama. Lubang ditutup kembali dengan tanah lalu lubang dipadatkan agar tidak tercium bau dari bangkai tikus tersebut.

4.9 Pengamatan Sediaan Histopatologi Paru – Paru Tikus

Jumlah eosinofil tikus jantan (*Rattus norvegicus*) diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x untuk menentukan lapangan pandang yang akan diamati, perbesaran 400x untuk mengamati gambaran histopatologi paru dan menghitung jumlah eosinofil di jaringan peribronkhial paru sebanyak lima lapangan pandang, dan konfirmasi dengan perbesaran 1000x untuk identifikasi eosinofil.

4.10 Alur Penelitian



4.11 Analisis Data

Data-data penelitian dianalisis menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way ANOVA*, uji *post hoc Bonferroni*, uji korelasi menggunakan analisis regresi linier yang pengolahannya menggunakan aplikasi SPSS 23 for windows.

a. Uji Normalitas

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk*, karena besar sampel yang digunakan ≤ 50 . Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah distribusi data normal. Sebaran data dinilai normal jika $p > 0,05$.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas menggunakan uji-varian Levene' test untuk mengetahui kehomogenan varian dari data-data yang diperoleh. Varian dinilai homogen jika $p > 0,05$.

c. Uji *One Way ANOVA*

Uji *one way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perlakuan terhadap pengamatan. Sebelum uji *one way ANOVA* telah dilakukan uji normalitas untuk mengetahui kenormalan data (data bersifat normal jika $\text{sig} > 0,05$) dan uji homogenitas untuk mengetahui kehomogenan varian dari data yang diperoleh (data bersifat homogen jika $\text{sig} > 0,05$). Selanjutnya untuk membandingkan rata-rata dari 2 kelompok percobaan atau lebih, dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 0,05$, apabila diperoleh $\alpha > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang bermakna sebaliknya apabila $\alpha < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Uji *one way ANOVA* dan

post hoc *Boferroni* jika sebaran data normal dan varian sama, dengan uji *one way ANOVA* dan *post hoc* *Tamhane* jika sebaran normal dan varian berbeda, atau dengan uji *Kruskal-Wallis* dan *post hoc* *Mann-Whitney* jika sebaran tidak normal setelah transformasi data.

d. Uji *Post Hoc Bonferroni*

Uji *post hoc Bonferroni* merupakan kelanjutan dari uji *one way ANOVA* jika varian data homogen. Jika varian data tidak homogen menggunakan uji *post hoc Tamhane*.



